

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-500721

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)1月26日

|                           |       |                 |                          |
|---------------------------|-------|-----------------|--------------------------|
| (51) Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号          | F I                      |
| C 1 2 N 15/09             | Z N A |                 |                          |
| C 0 7 K 14/47             |       | 8318-4H         |                          |
| 14/705                    |       | 8318-4H         |                          |
|                           |       | 9050-4B         |                          |
|                           |       | C 1 2 N 15/ 00  | Z N A A                  |
|                           |       | (C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A                  |
|                           | 審査請求  | 未請求             | 予備審査請求 有 (全 11 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願平3-504047  
 (86) (22) 出願日 平成3年(1991)1月11日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)7月9日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 1 / 0 0 2 3 6  
 (87) 国際公開番号 W O 9 2 / 1 2 2 3 6  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)7月23日  
 (81) 指定国 C A , J P

(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァー  
 シティー オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
 94612-3550、オークランド、トゥエンテ  
 ィー セカンド フロア、レイクサイド  
 ドライブ 300  
 (71) 出願人 ザ、スクリップス リサーチ インスティ  
 テュート  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
 92037 ラ ホヤ ノース トーリー パ  
 インズ ロード 10666  
 (74) 代理人 弁理士 中島 淳 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なインテグリンβサブユニット及びその使用

## (57) 【要約】

本発明は、β<sub>s</sub>としてデザインされた新規なβサブユニ  
 ャットを含む実質的に純粋なインテグリンを提供する。こ  
 の新規なβ<sub>s</sub>サブユニットは、α<sub>v</sub>及びα<sub>β</sub>とヘテロダイマ  
 ーを形成する。β<sub>s</sub>含有インテグリンを用いた細胞接着を  
 調節する方法も、また提供される。

## 請求の範囲

1.  $\beta$  を含む、実質的に精製されたインテグリン細胞表面リセプターサブユニット。
2. ヒトにおいて、図3に説明されたアミノ酸配列を有する、請求の範囲1の実質的に精製されたインテグリン細胞表面リセプターサブユニット。
3.  $\alpha$ サブユニットに結合された $\beta$  を含む、実質的に精製されたインテグリン。
4. 前記サブユニットが $\alpha$  である、請求の範囲3のインテグリン。
5. 前記サブユニットが $\alpha$  である、請求の範囲3のインテグリン。
6.  $\beta$  に対して特異的な、実質的に精製されたアミノ酸フラグメント。
7. 請求の範囲6のアミノ酸フラグメントとしてコードする遺伝子を含むベクター。
8. 請求の範囲7のベクターを含む宿主。
9.  $\beta$  に特異的なアミノ酸配列に特異性を有する試薬。
10. 前記試薬が抗体である、請求の範囲9の試薬。
11.  $\beta$  をコードする、実質的に精製された核酸。
12. 請求の範囲11の核酸のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズする、実質的に精製された核酸。
13. 請求の範囲12の核酸と特異的にハイブリダイズし、且つ非 $\beta$ 、ポリペプチドをコードする核酸とハイブリダイズしない、実質的に精製された核酸。
14.  $\beta$ 、含有インテグリンを発現している細胞の、該 $\beta$ 、含有インテグリンに結合することができるリガンドに対する結合阻害方法であって、該 $\beta$ 、含有インテグリンと該リガンドとの結合をブロッキングすることを含む、細胞の結合を阻害する方法。
15. 前記ブロッキングが、前記 $\beta$ 、含有インテグリンとそれに対して特異的な試薬との結合によって遂行される、請求の範囲14の方法。
16. 前記ブロッキングが、前記 $\beta$ 、含有インテグリンのリガンドと該リガンドに特異的な試薬との結合によって遂行される、請求の範囲14に記載の方法。

## 明細書

新規なインテグリン $\beta$ サブユニット及びその使用

本研究は、米国立衛生研究所からの研究登録番号HL/AL33259、CA-47541及びCA-47858によって一部支援された。合衆国政府がこの発明についての権利を有する。

## 技術分野

この発明は、接着ペプチドとしてのリセプターに関し、特に細胞外マトリクス分子に対して親和性を有する新規なリセプターサブユニットに関する。

## 従来の技術

ヒトのような多細胞生物は、最低でも50の、例えば血液細胞及び神経細胞のような、異なるタイプに分裂され得る10<sup>11</sup>個の細胞を有する。成長及び発達過程において、細胞は他の細胞又は細胞外物質と、特定の又は通常の方法で接着する。このような細胞接着機構は、細胞成長、移動(migration)及び分化の仲介様式において重要であるように思われ、これによって細胞は、例えば筋肉細胞又は肝細胞として作用するように特定の性質へ発達する。細胞接着機構は、分化及び浸潤(invasion)、特に細胞がその特定の形態を失い転移性の癌細胞となる場合に、関連している。

細胞と他の細胞及び細胞外マトリクスとの相互作用を基礎となす機構は十分に理解されていないが、これらは、細胞表面上の又は細胞外マトリクス内の同様のリガンドを特異的に認識及び結合する細胞表面リセプターによって仲介されると考えられている。

細胞外マトリクスへの細胞の接着及びマトリクスにおける移動は、多くの場合、ルオシュラティ(Ruoslahti)とビルシュバッカー(Pierschbacher)の Science, 238: 491(1987)にまとめられているように、マトリクスタンパク質においてArg-Gly-Asp含有配列に対する細胞表面リセプターの結合によって仲介される。このArg-Gly-Asp配列は、少なくともフィブロネクチン、ビトロネクチン、フォン・ウィレブラントのフィブリノーゲン、トロンボポンチン

17. 前記試薬がRGD含有ペプチド又はポリペプチドである、請求の範囲15の方法。

18. 前記試薬がインテグリン結合部位を含むリガンドフラグメントである、請求の範囲15の方法。

19.  $\beta$ 、含有インテグリンを結合するリガンドの検出方法であって、該 $\beta$ 、含有インテグリンと該 $\beta$ 、含有インテグリンと結合すると思われる該リガンドを含む溶液とを接触すること、及び該 $\beta$ 、含有インテグリンに結合された該リガンドの存在を検出することを含む、リガンドの検出方法。

20.  $\beta$ 、含有インテグリンを発現する細胞における細胞接着を増加させる方法であって、細胞において、該 $\beta$ 、含有インテグリンの過剰発現を含む、細胞接着を増加させる方法。

21.  $\beta$ 、含有インテグリンを発現している細胞における細胞接着を減少させる方法であって、該 $\beta$ 、含有インテグリンとリガンドとの結合を含む、細胞接着を減少させる方法。

(thrombopontin)、オステオポンチン(osteopontin)及び、可能性としては多くのコラーゲン、ラミニン及びテナスチン(tenascin)における細胞接触部位である。これらの細胞接触部位の類似性に拘らず、それらのタンパク質は、特定のリセプターとの相互作用により、個々に認識され得る。

インテグリンは、細胞-細胞及び細胞-マトリクス接着を仲介する細胞表面糖タンパク質の大きなファミリーであり、例えば上記のルオシュラティ及びビルシュバッカーの論文に記載されている。この接着リセプターファミリーの既知のメンバー全ては、非共有結合的で互いに結合された $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットからなるヘテロダイマーである。インテグリンファミリーが最初に同定されたとき、インテグリンは、最初に認識された3種のサブユニット( $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 及び $\beta_3$ )に基づいて3つのサブファミリーにグループ分けされた。過去数年にわたって、哺乳類細胞からの3種及びショウジョウバエから1種の $\beta$ サブユニットの一次構造が、cDNAから推定された。

各 $\alpha$ サブユニットは、単一の $\beta$ サブユニットと独特に金合していると考えられた。11の異なる $\alpha$ サブユニットが、これまでに記述されてきた。しかし、新しいインテグリンが同定されると3種以上の $\beta$ サブユニットが明らかになるので、また、例えばゾーネンバーグ(Sonnenberg)らの J. Biol. Chem. 265: 14030-14038 (1988)に記述されたように、ある $\alpha$ サブユニットが1以上の $\beta$ サブユニットと会合し得るので、このグループ分けが全く満足するものではないことが明らかとなった。

通常及び非通常細胞プロセスの両方の、仲介の重要な側面におけるインテグリンの重要性から、異なるインテグリンの同定及び特性決定が要求されている。本発明は、この要求を満足し、その上、関連する利点を提供する。

## 発明の概要

本発明は、 $\beta$ 、として表されるインテグリン細胞表面リセプターの実質的に精製された $\beta$ サブユニットに関する。 $\beta$ 、のアミノ酸配列は図3に挙げられている。

本発明は、また、様々な使用法を有する $\beta$ 、に特異的なアミノ酸フラグメントに関する。本発明は、更に、このようなフラグメントをコードする遺伝子を有す

るベクターに関する。このようなベクターを含む宿主細胞も、また提供される。 $\beta$ 。配列をコードする核酸及び $\beta$ 。をコードする核酸と特異的にハイブリダイズする核酸も同様に、本発明の他の態様である。

更に他の態様では、本発明は、 $\alpha$ サブユニット、特に $\alpha$ 。又は $\alpha$ 。に結合された $\beta$ 。を含む実質的に精製されたインテグリンに関する。そのリガンドに対する $\beta$ 。含有インテグリンの接触をブロックする方法及び、そのリガンドに対するこのようなインテグリンの結合を検出する方法も、また提供される。

本発明は、また、インテグリンの過剰発現による、又はビロネクテンのようなリガンドとインテグリンとの結合による、 $\beta$ 。含有インテグリンを発現する細胞における細胞接着を増加又は減少させる方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、PCRプライマーのデザインを示している。

図2は、配列決定ストラテジーのマップを示している。

図3は、ヒト(H)及びモルモット(GP)の $\beta$ 。における、ヌクレオチド配列及びアミノ酸翻訳を示している。

図4は、既に報告されている4種のインテグリン $\beta$ サブユニットのアライメントを示している。

図5は、B3Fプライマーからすぐ下流の部位における、ヒト(H)及びモルモット(GP)の $\beta$ 。、 $\beta$ 。、 $\beta$ 。及び $\beta$ 。からの、部分的ヌクレオチド及びアミノ酸配列のアライメントを示している。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、ここでは $\beta$ 。と呼ばれる新規な実質的に精製されたインテグリン $\beta$ サブユニットに関する物質の成分を提供する。 $\beta$ 。のアミノ酸配列も、また提供され、図3に示されている。

「実質的に精製された」とは、生来環境又は自然環境に普通に関連した夾雑物を、実質的に含まないことを意味する。

「 $\beta$ 。」とは、ヒト及びモルモットの $\beta$ 。において、図3に説明されている配

列を得る。 $\beta$ 。の特徴的な11アミノ酸細胞質尾部は、シグナル伝達における制御又は経路が $\beta$ 。、 $\beta$ 。及び $\beta$ 。のものとは異なり得ることを示している。

$\beta$ 。、 $\beta$ 。及び $\beta$ 。に加えて、最近の研究は、5種の他のインテグリン $\beta$ サブユニットの存在を示唆している。約210,000の分子量を有する $\beta$ サブユニット( $\beta$ 。)は、結腸癌細胞及び、例えばカジジ(Kajiji)らのEMBO J. 8:673-680 (1989)に記載されているような上皮起源の多くの他の腫瘍細胞において、インテグリン $\alpha$ サブユニット" $\alpha$ 。"と会合していることが発見された。対象の新規タンパク質の106,000の予想されたサイズと比較して、210,000の高い分子量に基づいて、及び明らかに異なるアミノ末端配列に基づいて、 $\beta$ 。は、対象ポリペプチドと同一でないことは明らかである。

元々 $\beta$ 。と称されている他の $\beta$ サブユニットは、例えばツェリッシュ(Cheresh)らのCell. 57:59-69 (1989)に記載されているように、インテグリン $\alpha$ サブユニット $\alpha$ 。と会合している上皮誘導腫瘍細胞において同定された。この $\beta$ サブユニットは、特徴的なアミノ末端配列を有し、最近新たに $\beta$ 。と名付けられた。精製調製の最近の研究に基づいて、 $\beta$ 。は、本発明の $\beta$ サブユニットと明らかに異なる。本報告において記載されている $\beta$ サブユニットは、配列情報が有効である5種の各 $\beta$ サブユニットと異なるので、 $\beta$ 。として表される。

2つの他のインテグリン $\beta$ サブユニットの存在は、既知の $\alpha$ サブユニットに対する抗体による表面標識化細胞溶解物の免疫沈降後の、特徴的なタンパク質の同定から推測されている。これらの新規なタンパク質の1つは、 $\beta$ 。と称され、ヒトの骨肉腫細胞株MG-63、繊維芽細胞株AF1523及び、例えばフリード(Freed)らのEMBO J. 8:2955-2965 (1989)に記載されているようなヒトの内皮細胞において、 $\alpha$ 。と会合することが認められた。表1に示されるようにこれらの細胞において $\beta$ 。が発現していないが、MG-63細胞において $\beta$ 。が発現しているので、このサブユニットは、また、 $\beta$ 。と異なる。

既知の $\alpha$ サブユニットの同時免疫沈降により同定された他の新規なインテグリン $\beta$ サブユニット、 $\beta$ 。は、 $\alpha$ 。と会合されることが認められるM.約95,000のタンパク質であり、例えばホルツマン(Holzmann)らのCell. 45:37-46 (1989)に記載されたようにリンパ球ホーミングレセプターVLA-4の一部として、最初

列によりコードされるポリペプチドの、実質的に同一なアミノ酸配列及び結合機能を有するポリペプチドを意味する。従って、実質的にその機能を破壊されてなく、 $\beta$ 。の必須配列を保持する修飾アミノ酸配列は、 $\beta$ 。の定義内に含まれる。 $\beta$ 。の配列と50%以下のホモロジーを有する $\beta$ 。、 $\beta$ 。及び $\beta$ 。の配列のようなアミノ酸配列は、実質的に同一の配列ではなく、従って、 $\beta$ 。の定義内に入ることではない。ここで説明されるアミノ酸配列を前提として、追加物、欠損物又は置換物は作成されることができ、 $\beta$ 。の機能に対するそれらの効果を決定するために試験されることができる。更に、例えば保存されたシステインのような特定アミノ酸が $\beta$ 。の結合機能を変えるために修飾され得ることは、当業者に認識されるであろう。

アミノ酸は、ここで下記の通常の1文字表記によって同定される：

| アミノ酸     | シンボル |
|----------|------|
| アラニン     | A    |
| アスパラギン   | N    |
| アスパラギン酸  | D    |
| アルギニン    | R    |
| アスチニン    | Q    |
| グルタミン    | G    |
| グルタミン酸   | E    |
| グリシン     | H    |
| ヒスチジン    | I    |
| イソロイシン   | L    |
| ロイシン     | K    |
| リシン      | M    |
| メチオニン    | F    |
| フェニルアラニン | P    |
| プロリン     | S    |
| セリン      | T    |
| スレオニン    | V    |
| トリプトファン  | W    |
| チロシン     | Y    |
| バリン      | V    |

そのアミノ酸配列に基づいて、本発明の $\beta$ サブユニットは、 $\beta$ 。、 $\beta$ 。、 $\beta$ 。及び最近発見された他の $\beta$ サブユニットと明らかに異なる。例えば、 $\beta$ 。における11アミノ酸カルボキシル末端伸長は、 $\beta$ 。、 $\beta$ 。及び $\beta$ 。と異なる。 $\beta$ 。、 $\beta$ 。及び $\beta$ 。の短い細胞質尾部は、細胞骨格との相互作用部位及びリガンドとの長い細胞外ドメインの相互作用により始められるシグナルの伝達領域であると考えられている。これらの細胞質尾部は、またインテグリン機能の制御のための標的と

に発見された $\alpha$ サブユニットである。表1に示されたように、リンパ球において $\beta$ 。が発現していないが $\beta$ 。がリンパ球で発現しているので、このサブユニットは、また、 $\beta$ 。と異なる。

表1

$\beta$ 。の分布

| 細胞株:     | タイプ   | 結果 | 入手元   |
|----------|-------|----|---|
| FG-2     | 脾臓    | +  | カジジら<br>EMBO J 3:673-80 (1989)                  |
| Panc I   | 脾臓    | -  | メッツガー博士<br>デューク大学、N. C.                         |
| Colo-396 | 結腸CA  | +  | L.ウォーカー博士<br>サイテル、サンディエゴ<br>CA                  |
| UCLA P3  | 肺CA   | +  | L.ウォーカー博士<br>サイテル、サンディエゴ<br>CA                  |
| Hela     | 子宮頸部  | -  | ATCC #CCL-2                                     |
| Jar      | 膜CA   | +  | ATCC #HTB 36                                    |
| HT 1080  | 繊維肉腫  | -  | ATCC #CCL 121                                   |
| U 937    | 単球様   | -  | ATCC #CRL 1593                                  |
| M 21     | メラノーマ | -  | R.ライズフェルド博士<br>スクリッス クリニック<br>＆リサーチ財団<br>ラホヤ、CA |
| B 16     | メラノーマ | -  | R.ライズフェルド博士<br>スクリッス クリニック<br>＆リサーチ財団<br>ラホヤ、CA |
| MG 63    | 骨肉腫   | -  | ATCC #CRL 1427                                  |
| 組織:      | 子宮頸部  | +  |   |
|          | 大動脈内皮 | -  |   |
|          | 白血球   | -  |   |

本発明は、また、 $\alpha$ サブユニットに結合される $\beta$ を含むインテグリンを提供する。 $\beta$ は、他の $\beta$ サブユニットの最近の発見と矛盾なく、機能的インテグリンを形成するため多くの $\alpha$ サブユニットと会合し得る。ある実施例では、 $\beta$ は $\alpha_v$ と会合する。他の実施例においては、 $\beta$ は、ここで $\alpha_v$ と呼ばれる他の $\alpha$ サブユニットと会合する。この $\alpha_v$ 、 $\beta$ 、インテグリンは、 $\beta$ を含む他のインテグリンと同様に、例えば細胞外マトリクス分子のような分子を結合することができる。このような分子は、ここでは、リガンドと呼ばれる。特定実施例において、ある $\beta$ 、含有インテグリンは、ヒトロネクチン又はファイブロネクチンのようなArg-Gly-Asp含有ポリペプチドと結合することができる。 $\beta$ 、含有インテグリンの多種のリガンドとの結合は、当業において知られ、例えばルオシュラティ&ビルシュバッカーのScience, 238:491-497 (1987)に記載されているような手順に従って、確認され得る。

本発明は、また、 $\beta$ 、に対して特異的なアミノ酸フラグメントを提供する。 $\beta$ は新規な分子であるので、この $\beta$ サブユニットに特異的な多くのフラグメントが含まれる。 $\beta$ に対して特異的なフラグメントは、他の既知のインテグリン $\beta$ サブユニットフラグメントの配列と50%以下のホモロジーを有する配列を含む。これらのフラグメントは、既知のフラグメントと区別されるには、十分な長さが必要であり、従って、" $\beta$ に特異的"である。このようなフラグメントのアミノ酸配列は、 $\beta$ 、アミノ酸配列を同定する図を参照することによって、たやすく決定することができる。これらのフラグメントは、また、 $\beta$ 、サブユニットの結合機能を保持し、従って、例えば $\beta$ 、に特異的な試薬を調製するための免疫原として、又は本発明の新規な $\beta$ 、含有インテグリンを検出するためのインディケータとして、用いられ得る。当業者は、このようなフラグメントの他の使用についても知るところであろう。

本発明は、また、 $\beta$ 、に特異的なアミノ酸配列に特異性を有する試薬を提供する。 $\beta$ 、が関連する $\beta$ サブユニットに関して少なくとも50%のアミノ酸相違を有する新規なタンパク質であるので、当業者は、例えば $\beta$ 、に特異的なアミノ酸配列に特異的に反応し、これにより、 $\beta$ 、を他の分子と免疫学的に区別する抗体のような試薬をたやすく作成することができる。このような抗体を作成する多く

結合の阻害は、細胞接着を阻害することができる。或いは、細胞接着は、細胞による $\beta$ 、含有インテグリンの発現を増加することによって、促進され得る。

最後に、本発明は、 $\beta$ 、含有インテグリンを結合するリガンドの検出方法を提供する。この方法は、 $\beta$ 、含有インテグリンと $\beta$ 、含有インテグリンに結合すると思われるリガンドを含有する溶液との接触を含む。その後、 $\beta$ 、含有インテグリンと結合するリガンドの存在が検出される。

まとめると、本発明は、以下を請求する：

1.  $\beta$ 、を含む、実質的に精製されたインテグリン細胞表面リセプターサブユニット。
2. ヒトにおいて、図3に説明されたアミノ酸配列を有する、請求の範囲1の実質的に精製されたインテグリン細胞表面リセプターサブユニット。
3.  $\alpha$ サブユニットに結合された $\beta$ 、を含む、実質的に精製されたインテグリン。
4. 前記サブユニットが $\alpha_v$ である、請求の範囲3のインテグリン。
5. 前記サブユニットが $\alpha_v$ である、請求の範囲3のインテグリン。
6.  $\beta$ 、に対して特異的な、実質的に精製されたアミノ酸フラグメント。
7. 請求の範囲6のアミノ酸フラグメントとしてコードする遺伝子を含むベクター。
8. 請求の範囲7のベクターを含む宿主。
9.  $\beta$ 、に特異的なアミノ酸配列に特異性を有する試薬。
10. 前記試薬が抗体である、請求の範囲9の試薬。
11.  $\beta$ 、をコードする、実質的に精製された核酸。
12. 請求の範囲11の核酸のヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズする、実質的に精製された核酸。
13. 請求の範囲12の核酸と特異的にハイブリダイズし、且つ非 $\beta$ 、ポリペプチドをコードする核酸とハイブリダイズしない、実質的に精製された核酸。
14.  $\beta$ 、含有インテグリンを発現している細胞の、該 $\beta$ 、含有インテグリンに結合することができるリガンドに対する結合阻害方法であって、該 $\beta$ 、含有インテグリンと該リガンドとの結合をブロックすることを含む、細胞の結合を

の方法は、十分に確立され、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, E. ハーロウ(Harlow)及びD. レーン(Lane)、コールド・スプリング・ハーバー研究所、1988, pp.139-283、並びにヒューズ(Huse)ら、Science, 24:1275-1280(1988)に記載されている。

本発明は、また、 $\beta$ 、をコードする核酸を提供する。このような配列の例は、図3に説明されている。例えば、マニアティスらのMolecular Cloning, コールド・スプリング・ハーバー (1982)に記載されているような、後述される標準的な方法によって、核酸配列は、適当な発現ベクターにクローン化され得る。このベクターは、それから組換えタンパク質を発現することができる宿主に挿入され得る。従って、本発明は、また、このような配列をコードする核酸を含むベクター及びこれらのベクターを含む宿主に関する。

図3に説明される配列は、また、診断を目的とするプローブとして用いられることができる核酸を提供する。このような核酸は、 $\beta$ 、に特異的なヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズすることができるが、非 $\beta$ 、タンパク質、特に他の細胞表面リセプターをコードする核酸とハイブリダイズしない。これらの核酸は、 $\beta$ 、の配列からたやすく決定されることができ、標準的な核酸シンセサイザーを用いて合成され得る。 $\beta$ 、のコード又は非コードDNAの両方に対して特異的にハイブリダイズする核酸も、また、提供される。

インテグリン細胞表面リセプターは、細胞外マトリクス分子のようなリガンドと結合する。しかし、リガンドに対するインテグリンの結合は、多くの手段によってブロックされ得る。例えば、 $\beta$ 、含有インテグリンの結合は、 $\beta$ 、サブユニット又は $\beta$ 、含有インテグリンを結合する試薬によって、ブロックされ得る。このような試薬の例には、例えばArg-Gly-Asp含有ペプチド及びポリペプチド、インテグリン結合部位を含むリガンドフラグメント、並びに、 $\beta$ 、又は $\beta$ 、含有インテグリンと特異的に反応する抗体も同様に、含まれる。或いは、このブロックは、リガンドのインテグリンとの結合を阻害する部位において、 $\beta$ 、含有インテグリンにより認識されるリガンド又はそのフラグメントとリガンドに特異的な試薬との結合によって行われ得る。リガンドに対する $\beta$ 、含有インテグリンの結合が細胞外マトリクス分子に対する細胞接着を介するので、この

阻害する方法。

15. 前記ブロックが、前記 $\beta$ 、含有インテグリンとそれに対して特異的な試薬との結合によって遂行される、請求の範囲14の方法。

16. 前記ブロックが、前記 $\beta$ 、含有インテグリンのリガンドと該リガンドに特異的な試薬との結合によって遂行される、請求の範囲14に記載の方法。

17. 前記試薬がRGD含有ペプチド又はポリペプチドである、請求の範囲15の方法。

18. 前記試薬がインテグリン結合部位を含むリガンドフラグメントである、請求の範囲15の方法。

19.  $\beta$ 、含有インテグリンを結合するリガンドの検出方法であって、該 $\beta$ 、含有インテグリンと該 $\beta$ 、含有インテグリンと結合すると思われる該リガンドを含む溶液とを接触すること、及び該 $\beta$ 、含有インテグリンに結合された該リガンドの存在を検出することを含む、リガンドの検出方法。

20.  $\beta$ 、含有インテグリンを発現する細胞における細胞接着を増加させる方法であって、細胞において、該 $\beta$ 、含有インテグリンの過剰発現を含む、細胞接着を増加させる方法。

21.  $\beta$ 、含有インテグリンを発現している細胞における細胞接着を減少させる方法であって、該 $\beta$ 、含有インテグリンとリガンドとの結合を含む、細胞接着を減少させる方法。

下記の実施例は、説明することを意図したもので、本発明を制限するものではない。

#### 実施例1

##### 新規な $\beta$ サブユニットの同定

##### ポリメラーゼ連鎖反応によるcDNAフラグメントの生成

オスのハートレイ系(Hartley outbred) モルモット (チャールズ・リバー・プリーディング・ラボラトリーズ、バーバー、メイン州) からハーベストされ

た気管上皮細胞は、コースターから市販されているコラーゲン被覆多孔質フィルター上に10~14日間にわたって、コンフルント状に成長させられた。RNAは、これらの初代培養物からハーベストされ、mRNAはファストトラックmRNA単離キット（インビトロゲン、サンディエゴ、カリフォルニア州）を用いてオリゴ（dT）セルロースカラムを通して精製された。2~5  $\mu$ gのmRNAは、20~40  $\mu$ lの反応容量において、モロニーマウス白血病ウィルスのリバーズトランスクリプターゼ（ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ、ゲイザーズバーグ、メリーランド州）200ユニットによる触媒作用で得られたcDNA合成の精製として用いられた。1~5  $\mu$ lの結果物cDNAが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の精製として用いられた。PCRは、25~200  $\mu$ lの反応容量において行われた。精製cDNAに加えて、各PCR反応は、50mMのKCl、10mMのTris-HCl（25℃においてpH 9.0）、1.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.01%のゼラチン、0.1%のTriton X-100、各々0.2 mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、並びに0.05ユニット/ $\mu$ lのTaq DNAポリメラーゼ（ユナイテッド・ステイツ・バイオケミカル・コーポレーション、クリーブランド、オハイオ州、又は、プロメガ、マジソン、ウィスコンシン州から入手）を含んだ。

各反応において、2つのオリゴヌクレオチドプライマーも、また、各々1  $\mu$ Mの最終濃度になるように添加された。このプライマー・ペアは、下記のように同定される。各反応混合物は、ミネラルオイルを上乗せされ、サーマルサイクラー（エリコンプ(Ericomp)、サンディエゴ、カリフォルニア州）において95℃で4分間加熱され、それから30サイクルのPCRに付される。各サイクルは、95℃45秒、53℃45秒及び72℃1分からなる。最終サイクル後すみやかに、試料は、10分間72℃で維持される。

各PCR反応の結果物は、1.5%アガロースのゲル電気泳動によって解析された。予想サイズのフラグメントを生成した反応物は、1.5%の低温溶解アガロース（バイオラッド・ラボラトリーズ、リッチモンド、カリフォルニア州）において電気泳動された。適切なサイズのバンドが抽出され、68℃において溶解され、DNAは、フェノール/クロロホルムによる抽出並びにエタノール及び酢酸アンモニア中での沈殿によって精製された。

列を認識するようにデザインされ、このプライマーとプライマー-B 4 Rとを組み合わせ、PCRが実施された。

図1は、PCRプライマーのデザインを示している。 $\beta$ サブユニット共通プライマー混合物は、ヒト $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$ 及びチキン $\beta_1$ の報告された配列のアライメントを基にしてデザインされた。正方向プライマー（B 1 F及びB 3 F）において、各コドンの各々最初の2つのヌクレオチドに対して可能なときはいつでも、プライマー配列は1ヌクレオチドを含み、通常、メチオニン以外のアミノ酸に対するコドンにおいて、第3の塩基としては、縮重している又はデオキシイノシン含有であった。逆方向プライマー（B 2 R、B 3 R及びB 4 R）は、相補的DNA鎖に対して同じようにデザインされた。2つの特異的正方向プライマーは $\beta_3$ を認識するようにデザインされた。第1のもの（BTE 2 F）は、種を越えて働くようにデザインされ、従って、第3のコドン位置において、縮重している又はデオキシイノシン含有であった。第2のBTE 3 Fは、縮重せず、モルモット $\beta_3$ のみを認識するようにデザインされた。

#### PCRにより得られたフラグメントのクローニング

個々のフラグメントは、下記のようにp Bluescript（ストラテジーン、サンディエゴ、カリフォルニア州）においてクローニングされた。精製フラグメントは、デオキシヌクレオチド含有蒸留水に再懸濁され、PCRの最終サイクル後に残された、全ての3'が引込んだ末端を充填するように、2.5ユニットのDNAポリメラーゼIラージフラグメント（プロメガ）によって処理された。5'末端は、5ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼ（ニュー・イングランド・バイオラブ(New England Biolabs)、ビバリー、メイン州）によって、リン酸化された。約100~200 ngのDNAを含有する上記の反応混合物を少量、EcoRV（プロメガ）で切断され、ウシ腸アルカリホスファターゼ（ペーリンガー・マンハイム、インディアナポリス、インディアナ州）で脱リン酸化されたp Bluescriptに組み込んだ。ライゲーションは、T4 DNAリガーゼ（ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ）で1時間22℃において行った。ライゲーション混合物は、コンピテント大腸菌(Escherichia coli) (JM109、クローンテック、サンフランシスコ、カリフォルニア州)を形質転換するために用いられた。

#### PCRプライマー

ここに記載される新規な $\beta$ サブユニットcDNAの開始フラグメントを得るために、PCRプライマーの縮重(degenerate)混合物を用いた。オリゴヌクレオチドは、標準手順によるDNAシンセサイザーを用いたカリフォルニア大学サンフランシスコ・バイオモレキュラー・リソース・センターにより、合成され、トリチル付与され、Nen-吸着カートリッジ（デュ・ポン・ニュー・イングランド・ヌークリアー(DuPont-New England Nuclear)、ボストン、マサチューセッツ州)を通して精製された。これらの共通プライマー混合物は、現在までに配列決定されたインテグリン $\beta$ サブユニットの各アミノ末端から約130アミノ酸で始まり、約300ヌクレオチド領域を挟んだ、高い保存性を有する配列をコードするヌクレオチドである Asp-Leu-Tyr-Tyr-Leu-Met-Asp-Leu（プライマー-B 1 F）及びGlu-Gly-Gly-Asp-Ala-Ile-Met-Gln（プライマー-B 2 R）と、アニールするようにデザインされた。ここで同定されたプライマーの配列は、図1に描かれている。

得られた最初の配列を基にして、特異的な正方向プライマーは、我々が配列決定した領域の3'末端から約49ヌクレオチドで終わるアミノ酸Pro-Leu-Thr-Asn-Asp-Ala-Glu-Arg（プライマー-BTE 2 F）をコードする配列とアニールするようにデザインされた。また、我々は、更に正方向プライマー（B 3 F）及び2つの逆方向プライマー（B 3 R及びB 4 R）を、Gly-Glu-Cys-Val-Cys-Gly-Gln-Cys（B 3 領域）及び、Ile-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Leu-Ile-Trp-Lys（B 4 領域）の配列をコードする高く保存された共通領域を認識するようにデザインした。ヒト $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 及び $\beta_3$ 、並びにチキン $\beta_1$ のすでに報告された配列とこれらのプライマーのアライメントは、図1に示されている。上述されたPCRは、モルモットの気管上皮細胞からのcDNAとBTE 2 F/B 3 R及びB 3 F/B 4 Rのプライマー・ペアとによって実施された。

BTE 2 F/B 3 Rのプライマー・ペアは、1095の新しい配列の更なる塩基対を産出した。この配列を基にして、他の特異的プライマー（BTE 3 F）は、この配列の3'末端に近いVal-Ser-Glu-Asp-Gly-Valの配

挿入部を含むプラスミドは、ファルマシア・ミニプレップ・ライシス・キット（ファルマシアLKBバイオテクノロジー・インク、ピスカタウェイ(Piscataway)、ニュージャージー州）を用いて精製され、0.3 MのNaOHにおいて変性され、更にセファクリルS-400（ファルマシア）含有スピンカラムを通して精製され、それからシークエナーゼ™バージョン2.0 シークエンシング・キット（ユナイテッド・ステイツ・バイオケミカル・コープ、クリーブランド、オハイオ州）及び〔<sup>32</sup>S〕dATP（アマシャム・コープ、アーリントン・ハイツ、イリノイ州）を用いて配列決定された。

#### ライブラリ・スクリーニング

B 1 F/B 2 R及びBTE 3 F/B 4 Rのプライマー・ペアによって生成されたPCRフラグメントは、 $\alpha$ 〔<sup>32</sup>P〕dCTPによって一様にラベルされ、ヒト肺癌細胞株FG-2から得られたmRNAからのプラスミドpTZ18-R-BstXI（インビトロゲン）において共に構築されたランダム・プライムcDNAライブラリ及びオリゴdTプライムcDNAライブラリをスクリーニングするためのプローブとして用いられた。プラスミドは、両方の領域にハイブリダイズすることがわかっているクローンから精製され、挿入部は配列決定された。1クローンからの挿入部DNAの一部は、次に標識化され、同一ライブラリを選別するために用いられた。14の独立した重複しているクローンは、pTZポリリンカーの領域を認識するプライマーを用いて両端から配列決定された。新しい $\beta$ サブユニットの推定される翻訳領域の3'末端側の領域は、3'末端に隣接する配列を認識するように構築されたプライマーを用いて、3クローンから両方向で配列決定された。従って得られた最初の配列に基づいて、更に、内部配列が、特定の制限エンドヌクレアーゼによる消化及び再ライゲーション後に、クローンT10、T11、T12及びT14から得られた（図2）。従って得られた3つの内部フラグメントは、p Bluescriptにおいてサブクローニング化され、両方向で、また配列決定された。報告された新しい配列の約90%が、DNAの両端より得られ、97%は、2以上の重複しているクローンから得られた（図2）。

図2は、配列決定ストラテジーのマップを示している。モルモット $\beta_3$ （クローン1 F、3 L、3 N及び3 Y；上）の部分的cDNA配列及びヒト $\beta_3$ （ク

ーンT1-T19:下)の完全配列を得るために用いられたクローンの位置が示されている。また、翻訳領域(タンパク質)の位置も示されている。膜通過ドメインの位置は、文字TMで示されている。示されたクローンは、しばしば幾つかの同一クローンの1つを表示する。長い挿入部を有するクローンの内部配列は、制限エンドヌクレアーゼ消化及びリリゲーション(relegation)によって、並びに、pBluescriptへの内部フラグメントのライゲーションによって、得られた。使用された特定制限部位は示されている(Hind, HindIII: Hinc, HincII: Kpn, KpnI: Pst, PstI)。配列決定の方向及び伸長は矢印で示されている。1109及び1110は、オリゴヌクレオチド配列決定プライマーにより認識された部位である。T18及びT19は、各々ポリ(A)尾部で停止していた。縮重PCRプライマーB1F(B1)、B2R(B2)、B3R/F(B3)及びB4R(B4)並びに $\beta$ 、プライマーBTE2F(BTE2)及びBTE3F(BTE3)により認識された領域は、上記のモルモットc/DNAマップにおいて注記されている。kbはキロ塩基を表す。

#### 新規モルモットインテグリン $\beta$ サブユニットのヌクレオチド配列

モルモット気道上皮細胞からのcDNAとB1F及びB2R(図1)の共通プライマー混合物を用いたPCRは、約350ヌクレオチドの予想されたサイズを有するDNAフラグメントを増幅した。フラグメントDNAが、pBluescriptにおけるクローニング後に配列決定された場合、組換えクローンは、各々2つの区別できる配列のうちの1つを有する挿入部を含有していた。一方の配列は、ヒト $\beta$ 、の予想領域と97%同一であり、従ってモルモット $\beta$ 、であると仮定された98アミノ酸の長さをコードしていた。他方の配列は、ヒト $\beta$ 、に対して53%、ヒト $\beta$ 、に対して45%及びヒト $\beta$ 、に対して57%のみ同一である98アミノ酸をコードしていた(図2、クローン1F)。両方のモルモット配列は、インテグリン $\beta$ サブユニット共通配列であるSer-X-Ser-Met-X-Asp-Asp-Leu及びGly-Phe-Gly-Ser-Phe-Valを含み、共に、全ての既知のインテグリン $\beta$ サブユニットにおけるこの領域内に認められる、2つのシステイン残基を含有していた。これらのデータは、我々が得た2つの配列のうちの1つがインテグリン $\beta$ サブユニットファミリーの新しいメンバー

側の非翻訳領域を除く)、並びにモルモット気道上皮細胞cDNAのPCRにより得られた配列の1732ヌクレオチドのアライメントを示している。両種において、配列決定された領域から推論される577アミノ酸のうち、36残基だけが異なる: アミノ酸配列は94%同一である。更に、両種において配列決定された1732ヌクレオチドのうち、91%が同一である。ヒト $\beta$ 、の推定細胞外ドメインに存在する9のグリコシレーション可能部位は下線で示される。モルモット $\beta$ 、において得られた577アミノ酸の内部にある7全てのこれらの部位は、モルモットタンパク質においても存在する。このグリコシレーション可能部位全てが平均分子量2,500を有するオリゴ糖によって占有される場合、ヒト $\beta$ 、の予測分子量は、106,000となるであろう。

既に配列決定された3つのヒト $\beta$ サブユニット及びショウジョウバエのミオスフェロイドタンパク質に対するオープン・リーディング・フレームから推論された788アミノ酸配列の比較は、図4に示されている。

図4は、4つの既に報告されているインテグリン $\beta$ サブユニットとの $\beta$ 、のアライメントを示している。既に報告されているヒト $\beta$ 、ヒト $\beta$ 、ヒト $\beta$ 、、ショウジョウバエのミオスフェロイド遺伝子産物( $\beta$ myo)の配列及び $\beta$ 、として記述された新規な配列が、1文字アミノ酸コードを用いて示されている。各列の上に、56の保存されたシステインは★で、及び120の他の非変異型アミノ酸は=で、表している。膜通過ドメインは下線が付けられている。共通 $\beta$ サブユニットプライマーB1F(B1)、B2R(B2)、B3F/R(B3)及びB4R(B4)を構築するために用いた領域は、ボールド文字でアライメントの下に標識された。右側マージンに沿った数字は、各推定シグナル配列の第1アミノ酸から開始した各列における最後のアミノ酸番号を表している。

他の各 $\beta$ サブユニット及び56の保存システイン残基を含む $\beta$ 、において同一である179アミノ酸残基が存在する。 $\beta$ 、と他のヒト $\beta$ サブユニットとの間で同一なアミノ酸の総率は、 $\beta$ 、に対して47%、 $\beta$ 、に対して42%、 $\beta$ 、に対して38%である。ヒト $\beta$ 、は、ショウジョウバエの $\beta$ サブユニットに対しても39%同一である。ヒト $\beta$ 、 $\beta$ 、及び $\beta$ 、並びにショウジョウバエ $\beta$ サブユニットの全ては、41アミノ酸(図4において下線によって示されている推定膜通過ドメインの後か

をコードしていたこと示唆している。

この新規な配列は、更に2つの縮重プライマーを組み合わせて(B3R及びB4R、図1、2及び4を参照)、新規な配列に特異的なプライマー(BTE2F及びBTE3F)を利用して、更にPCRを行うことによって伸長された。BTE2F/B3Rのプライマー・ペアを用いて、2つの異なるcDNA生成物が、220ヌクレオチド更に下流の部位(図2におけるB3')とB3Rプライマーとの予想しなかったハイブリダイゼーションによって得られた(図2における3L及び3N)。これらのクローンによって決定された1732ヌクレオチド配列は図3に示されている。

図3は、ヒト(H)及びモルモット(GP)の $\beta$ 、におけるヌクレオチド配列及びアミノ酸翻訳を示している。アミノ酸翻訳は、ヒト $\beta$ 、の翻訳領域から、各コドンの第2ヌクレオチドの下に1文字コードによって表した。モルモットの配列において、ヒトの配列と異なるアミノ酸のみが示されている。右側マージンに沿ってある数字は、各列の最後に入るヌクレオチド又はアミノ酸番号を表している。用いられたナンバリングシステムは、示された各配列に有効な第1ヌクレオチド又はアミノ酸により開始された。ヒト $\beta$ 、の推定される細胞外ドメインにおけるN-グリコシレーションの9の可能部位には、下線を付した。

#### ヒト $\beta$ 、ヌクレオチド配列

モルモットcDNAプローブ1F及び3Y(図2参照)によるヒト脾臓癌細胞株FG-2から構築されたcDNAライブラリのスクリーニング、並びにクローンT10の部分から構築されたプローブによるその次のスクリーニングは、14の独立した陽性クローンを生成した。2つの最長クローン(T18及びT19)は、ポリ(A)尾部まで伸長していた。アガロースゲルにおけるこれらのクローンの切り出された挿入部の配列情報及び移動度に基づいて構築された、これらのクローンのマップは、図2に示されている。このマップは、5'末端において、少なくとも226ヌクレオチドの非翻訳領域、2364ヌクレオチドのオープン・リーディング・フレーム及び約2.5キロ塩基の3'非翻訳領域を含む、約5キロ塩基のmRNAを予測し得る。この分子は、インテグリン $\beta$ 、と命名された。

図3は、ヒト $\beta$ 、における部分的ヌクレオチド及び完全アミノ酸配列(最も3'

から開始する)からなる細胞質領域を有する。 $\beta$ 、がこの細胞質領域において10の保存されたアミノ酸残基を各々含むが、カルボキシル末端における11アミノ酸伸長も含む。 $\beta$ 、は、2つのArg-Gly-Asp配列も、一方は514-516番アミノ酸に、他方は594-596番アミノ酸を含む。これらの領域は、インテグリンファミリーの他のリガンドにおける認識部位として作用し得る。

プライマー・ペアB3F/B4R(図1参照)を用いたPCRは、約750ヌクレオチドの予想サイズのフラグメントを増幅した。このフラグメントのクローニング及び配列決定は、新規な $\beta$ サブユニット配列を含む如何なる更なるクローンも生じず、ヒト $\beta$ 、に該当する領域に対して97%同一であるアミノ酸配列をコードする挿入部を有する幾つかのクローン及び、ヒト $\beta$ 、に対して93%同一であるアミノ酸配列をコードする幾つかの他のクローンを生じた。これらは、恐らく各々 $\beta$ 、及び $\beta$ 、のモルモット相同物である。モルモットのヌクレオチド配列とヒト $\beta$ 、とは、80%同一であり、モルモットのものとヒト $\beta$ 、との場合は、91%同一である。

図5は、B3Fプライマーのすぐ下流の領域におけるヒト(H)及びモルモット(GP)の $\beta$ 、 $\beta$ 、 $\beta$ 、及び $\beta$ 、からの、部分的ヌクレオチド及びアミノ酸配列のアライメントを示している。1文字コードで表されたアミノ酸翻訳物は、各コドンの第2ヌクレオチドの下に示されている。モルモットの配列においては、ヒトの配列と異なるアミノ酸のみが示されている。右側マージンに沿って示されている数字は、ヒト $\beta$ 、におけるヌクレオチド番号を表している。ヒト $\beta$ 、及び $\beta$ 、の配列は、既に報告されている論文からのものである。

#### 実施例II

##### $\beta$ 、は $\alpha$ 、及び $\alpha$ 、サブユニットと会合する

本発明の新規 $\beta$ サブユニットが他の既知のインテグリンと同様に $\alpha$ 鎖と会合していることを決定するため、 $\beta$ 、の細胞質ドメインからのペプチドに対する抗血清を調製した。下記の $\beta$ 、の細胞質ドメインからのアミノ酸ペプチドは調製され、免疫ラビットに対して用いた: 即ち、RGSTSTFKNVYKHR(763-



|          |           |  |                                     |
|----------|-----------|--|-------------------------------------|
| β, プライマー | nt<br>219 | CCATTGACAAATGATCTGAAAGA<br>P L T N D A E R | 5'CCITTACIATGATCGICGAAAGA 3'<br>C C |
| β, モルモット | 1325      | CATCTCCGAAGACGGCA<br>I S E D G             | 5'CATCTCCGAAGACGGCA 3'              |
| β, モルモット | 1325      | CATCTCCGAAGACGGCA<br>I S E D G             | 5'CATCTCCGAAGACGGCA 3'              |

FIG. 1B

A 6 ヒト (H) TAAACACAGCTTTTCTGCTTTACCTGTCCAGGTAGCCTCTGTTTTCATT  
 B6H AGTGTAAAGTAGTATTTAAAATGTTATACTTCAAGAAAGAAAGACTTTAACG  
 B6H CTCGCACAGCAAGAAGCTGAAACGAATGGGATGTAAGCTGCTTGCTGTGC  
 B6H GGTGCAAGAACTGTGAAGACTGCCTGCTTATGGCACTCAGTGTGCTGG  
 B6H G A E T C E D C L L I G P Q C A G A A A C  
 B6H ACCCCAGCAAACTTTAGCTAAAGGATGCAATTAACCTTCATCGAAAC  
 B6H T P A N L L L A K G C O L N F I E N  
 B6H CAGAAAAATAGTTTGCATGTTTCAGATTGCACCTCAAGAGCTTGATCCTT  
 B6H Q K N S S D D I V Q I A P Q S L I L  
 B6H GAGGATCTCCGTTGGAATTGTATTACCTCATGGACTCTCCGCTCCATG  
 E D Y P V D L Y L M D L S C S A S M  
 B6H ATGTCTAAATTAAACGCAACCTTTAGACTGGGCTTCGGATCTTTGTGGAA  
 B6GP M S K L T T S N F R L G F G S F V E  
 B6H ATGTCTAAATTAACTAGCAACTTTAGACTGGGCTTCGGCTCTTTGTAGAA  
 B6H TGCAGTAGTATTCATCTCTGTTTACCTACTTATTTGGATTCAAGCACAT  
 B6GP C S S I P Y F C L T P T F G F K H I  
 B6H TGCAGTAGTATTCATATATCTGCTTACCTACATTTGGATTCAAGCACATT  
 B6H AAAATTTCTGCTAATATTGACACACCCGAAGGTGGATTGTATGCAATATG  
 B6GP K I S A N N I D T P E G G F D A I M  
 B6H AAAATTTCTGCTAATATTGACAACCTCGAAGGTGGATTGCAGCCATTATG  
 B6H CTCTGGTCTTTGTGAGTGATGCTGATTCTCATTTTGGAAATGGACAGCAA  
 B6GP L L T F V S D A D T C H F G M D S K K  
 B6H CTCTAGTCTCTGTGAGTGATGCCGATTCATTTTGGAAATGGACAGCAA  
 B6H A N G A A T C T C A T G T C A A C T G T C T T G G A A T C C A A C A A C T  
 B6GP A T G A A T A C T C C A T G T C A A C T G T A T G G A A T C C A A C A A T G G A C A C T  
 B6H GAACAAGTTCATTATATGAGAATTACGCAAAACTTCTCTGGAGTGACA  
 B6GP E O V H L Y E N Y A K L I P G A T  
 B6H GAACAAGTTCACCTATGAGAATTATGCAAAACTTATCTCTGGAGGCACA  
 B6GP P  
 B6H GCTTATGAAGAACTGCGGCTGTGAGGTGGAAGTGAAGATATTAGGAGACCT  
 B6GP G T Y E E L R S E V E L E V L G D T  
 B6H ACTTATGAAGAACTGCGGCTGTGAGGTGGAAGTGAAGATATTAGGAGATACA

FIG. 3A

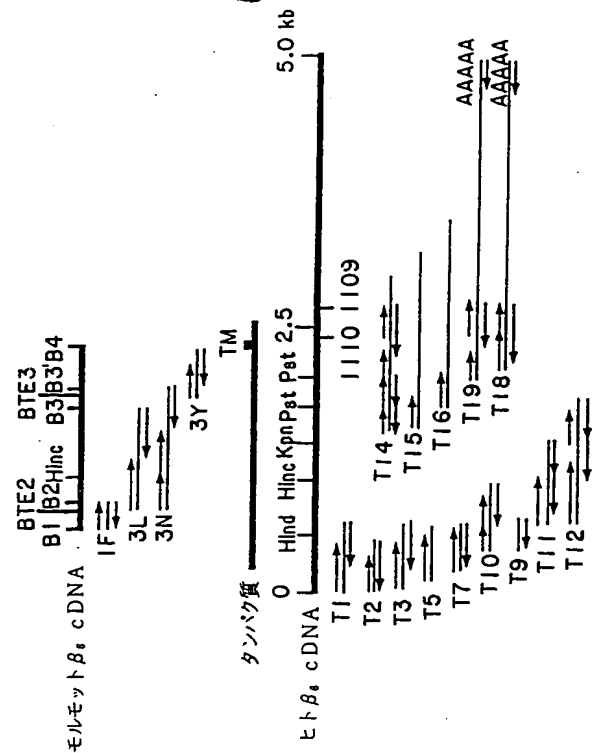


FIG. 3B

|   |      |
|---|------|
| TCAGTCTTAATGAAACCTTCTAACCTATATCTCAAGTTCTCTTTCAAAGC        | 100  |
| ATATTACGCGTGGTCTTGTAAACGCTGAAGGTAATTCATTTTTAATCGGT        | 202  |
| TTTCTATTCTAGGAAGGAATGATTCAGCTCAAGGTGGCTGTGCTGGGA          | 304  |
| F L F L G R N D S R T R W L C L G                         | 26   |
| TGTGCTCAGGAGAAATTTACTCATCTCATCTGGAGTGGCGAAAGGTGTAT        | 406  |
| C A Q E N F T H P S G V G G E R C D                       | 60   |
| CCTGTCTCCCAAGTAGAAATACTAAAAATAAGCCTCTCAGGTGATGGCAGA       | 508  |
| P V S Q V E I L L K N K P L S V G R                       | 94   |
| AAGTTGAGACACAGGTGGTGCGCAGACTCTGCAGGTGCATCTGCCCGCAACT      | 610  |
| K L R P P G G T T L Q V H V R Q T                         | 128  |
| GATGACGACCTCAACCAATAAAGGAGCTGGGCTCCGGCTCTTTCAAAGAG        | 712  |
| D D D L N T I K E L G S G L S K A E                       | 162  |
| GACGATGACCTCAACCAATCAAGAGCTGGGCTCCCTGCTTCAAGGGAG          | 63   |
| AAACCTGTATCCCTTTTGTGAAACAACACCAAGAAATATGCCAACCCCT         | 814  |
| K P V S P F V K K T T P E E I L A N P                     | 196  |
| AAACCCGCTCTCCCTTTTATGAAAACAACACAGAGGAATATGCCAACCCCT       | 165  |
| M   | 55   |
| TGCCATTGACAANATGATGCTGAAGATTCAATGAAATTTGGAAGATCAG         | 916  |
| L P L T N D G A A G T C A A A T T G G A A A C A G         | 230  |
| CTGCCATTGACAAATGATGCTGAAGAAATCAATGAATTTGGAAGAACAG         | 267  |
| CAAGCTGCTGTGGTGTGAAGAAAAAATTGGCTGGCGGAATGACTCCCTCAC       | 1018 |
| Q A A G T G T G T G K A A G A A A A I G T G W R N D S L H | 264  |
| CAAGCTGCTGTGGTGTGAAGAAAAAATTGGCTGGCGGAATGATTCGCTCAT       | 369  |
| CTAGCAGGCATCGTCATTCTAATGACGGGCTCTGTCACTTGGACAGCAAG        | 1120 |
| L A G G I V I P N D G L C H L D S K                       | 298  |
| CTGGCAGCATTTGCTATCCCAACGATGGGCTGTGCTCACTTGGACAGCAAG       | 471  |
| ATTGATAAACTGGTACAAAACAACGTGTTATTGATCTTCGCTGTAACCCAA       | 1222 |
| I D K K L V Q N N V L I F A V T Q                         | 332  |
| ATTGATAAAGTGGTACAAAACAATGTGTTACTGATCTTTGCTGTGAACCCAA      | 573  |
| GTAGGTCTACTTCAGAAGGACTCCGGAAACATCTCCAGCTGATCATCTCA        | 1324 |
| G G L L T C G G N I T Q L I I L S                         | 366  |
| GTGGGGCTACTTCCAAGGACTCTGGAAACATCTCCCACTGATCATCTCA         | 675  |
| GAAGGCTCAACTGTGATCTACAGCATCTGTAAACACGGTAGCCCTCTTC         | 1426 |
| E G L N I S F T A I C N N G T L T                         | 200  |
| GAGGGCTCAACTCTTCGTCTCAGCTGTCTGTAAACATGGTACTCTCTTC         | 775  |
|   | 259  |



B6H CAACACCAAAAGAATGCTCTACATGAAAGTGGG:GACACAGCTTCCTTC  
 Q H P K K K C S H M K V G D T A S F  
 B6GP CCACACCAAAAGAATGCTTGACATGAAAGTGGGAGAAACAGCTTCATTC  
 P C E  
 B6H ATAAGCCTGTGGGGCTGGGGGATGCCCTGGAATTACTTGTCAGCCAGAA  
 I K P L G G D A L E L L V S P E  
 B6GP ATAAGCCTGTGGGGCTGGGGGACACCTTGGAAATCTTGTCAGCCAGAA  
 A C  
 B6H CACGGGAACGGCTCTTTCCAGTGTGGGGTGTGTGCTGCCACCTGCCAC  
 H G N C V C G V C A C H C P G H  
 B6GP AATGGGAACGCTCTTACCAAGTGTGGGGTGTGTGCTTGAACCCAGGCCAC  
 N T N  
 B6H AAGGAGGCCCCAGATCACTCTTCAGCTGCAGCGGAAGGGGTGACTGCTACTGT  
 K E A T D H P S C S C G R G D C Y C  
 B6GP AAGGAGACCCAGACCATCCTCTGTGCAGCGGAAGGGGTGACTGCTACTGT  
 T  
 B6H TGCCAGTGTGCAATTTCTCTCGTGTGAGACAAAGGGCTGCTCTGCGGA  
 C Q C D F C C G A R H K G L  
 B6GP TGCCAGTGTGCAATTTCTCTGTGTGAGGCACAAAGGGCTGCTCTGTGA  
 C  
 B6H GGCAGTAGTCTCAACTGCACACAGCAGCAAGCACTCTGCTGTCTGAAGAT  
 G A Y C C N C T T S T D S C S E A D  
 B6GP GGAAGTAGTCTCAACTGTACCAACAGCAGCAGCACTGCAATCTCGAAGAC  
 C  
 B6H ACAAAACCTTGAAGCTCAGGACCAADCTGTGAACGATGTCTTACCTGTGT  
 T N P P G A S G P T C E R C T P T C  
 B6GP ACGAAACCTTGAAGCTCGGAGCCACTGTGAACGATGTCTTACCTGTGT  
 C  
 B6H GGCCAAGCGGAGAAGAATGTGTGGACAAGTGCAAACTAGCTGGTGCAGC  
 G Q A G G E E K C K L A G A T  
 B6GP GTGCAGCTTGAAGAGAATGTGTGGACAATGCAAACTAGCAGAGTGTACC  
 P  
 B6H CAAGGAGAAAATGAATGTTAATTACATTCCTAATAACTACAGATAATGAG  
 Q G E N E C L I T T F L T D N E  
 B6GP CAAGGAGAAAATGAATGCTATTACATTCCTAATAAGTACAGATAATGAG  
 C  
 B6H AACATTCCCATGATCATGTAGGGGTTCCCTGGCTACTCTTCTCATCGG  
 N I P M L L G V S T L L I S  
 B6GP AATATTCTATGATCATGTGTGGGGTTTCACTGGCTA  
 C  
 B6H GAAGTGTCCAATTTGAAGCAGAACGATCAAAGCCAAGTGGCAACGGGA  
 E V A K K F E A E R S K A K W Q T  
 B6H AAACACAGGGAAAKAAAGAGGTAGACCTTTCCAGCAAGTTGTAGAATCA  
 K H R E E K K Q K V D L S T D C

FIG. 3C

|   |      |
|---|------|
| AGCGTGACTGCGAATATCCCAACCTGCGAGAGAAAGACGAGGCACATTATC                                     | 1528 |
| S V T T V N S P H C E R R R H I I A   | 434  |
| AATGTGACTGTGAGTATACCAAACTGTGAGAGAAAAGCAGGCATGTTATC                                      | 879  |
| N T S S N K V T   | 293  |
| TGCAACTGCGCATGTGCAGAAAGAGTGGAACTGGAACGCTCCAAATGTGCAC                                    | 1630 |
| C N C C D C Q K E V E V N S S K C H   | 468  |
| TGCACTGTGGATTGTGCAGAAAGAGTGGAAAGTGAACGCTCCAAATGCCAC                                     | 981  |
| S   | 327  |
| ATGGGCTTCGCTGTGAGTGTGGCGAGGACATCTGAGCAGCAATTCCTGC                                       | 1732 |
| M G G P R C E C E D M L S T D S C   | 502  |
| ATGGGCCCTCATCGCAGTGTGGTGAGGACACGCTGAGCAGATTCTCTGC                                       | 1083 |
| H   | 361  |
| GGGCAGTGTATCTGCCACTTGTCTCCCTATGGAAACATTTATGGACCTTAT                                     | 1834 |
| G Q C I C H L S G N I V G P Y   | 536  |
| GGGCAGTGCATCTGCCACTGTCTCCCTATGGAAACATTTATGGACCTTAC                                      | 1185 |
|   | 395  |
| GGTAACGGGCACTGTGACTGTGGTGAATGTGTGTGCAGGAGCGCGTGGAAT                                     | 1935 |
| G W G D C T G E G M T   | 570  |
| GATAACGGGAGCTGTGAATGTGGGAAGTCGCTGTGCAGGAGTGGTGGACAT                                     | 1287 |
| E   | 429  |
| GGAGTGTCTGCGACGGCGGGCGGAGCTGTGTTGTGCAGAGTGGTGTTCG                                       | 2038 |
| G V L L C S G R G D C V C G K C V C   | 604  |
| GGCAGCTCTGCGACGGCGGGGAGCTGCCTGTGTGCGAGTGTGTCTGC   | 1389 |
| T   | 463  |
| GACCCCTGTAACCTCTAAACGGAGCTGCATTGAGTGCACCTGTGCAGAGCT                                     | 2140 |
| D P C N S K R S C T G E C H L S S A A   | 638  |
| GACCCCTGTAACCTCTAAACGGAGCTGCATTGAGTGCACCTGTGCAGAGT                                      | 1491 |
| S   | 497  |
| ATCAGTGAAGAAGAAGATTCTCAAGGATGGTTCTGTTTCTGCTCTCTG  | 2242 |
| S I E E E D F T C D G S V S C S A A   | 672  |
| ATCAGCAAAAGAGCAGATTCTCAAGGATAGTTCTGTTTCTGCTCTCTG  | 1593 |
| K   | 531  |
| GGGAAACCATCATTCACAGCATCAATGAAAAGATTGTCCGAAGCCTCCA                                       | 2344 |
| G G A A A A C C A T T C A C A C A T C A G T G A A A A G A C T G C C C A A A C C T C C A | 706  |
| K D P   | 1695 |
| GTGTCTCTACTGTGCATCTGGAAGTACTGGTGTCAATTCATGATCGTAAA                                      | 2446 |
| V V L L L C I W K L L V S F H D R K   | 740  |
|   | 1732 |
| ACCAATCCCTCTACAGAGGATCCCAAGTACTTTTAAAAATGTAACTTAT                                       | 2548 |
| T N P L Y R R S T S T F K N V T Y   | 774  |
| TTATGCATAAAAAAGTCTGTTTCACTGATATGAAATGTTAATG   | 2644 |
|   | 788  |

FIG. 3D

FIG. 4A

|                                  |                      |       |
|----------------------------------|----------------------|-------|
| MNLOPIFWICGLISSVCCVFQOT          | B,                   | E†    |
| MLGURPPPLALVGLLSIGCV             | B,                   | E†    |
| HNRPRPRLHVTVALCAGLAGVG           | B,                   | E†    |
| MILERNRCQLALLMIAMLAAIAAQTNQRAKLT | B <sub>90</sub> , B, | シウツウエ |
| MGTELCCLFFFLGRNDR                | B,                   | E†    |

[illegible]

FIG. 4B

[illegible]

**FIG. 4C**

[illegible]

**FIG. 5**

## 請求の範囲



文部科学省

## 1. 特許出願の表示

## 2. 発明の名称

## 5. 特許出願人

国籍 アメリカ合衆国

#### 4. 代理人

氏 名 (7904) 井理士 中 島 淳

5. 補正書の提出年月日

1993年 2月 3日

## 6. 添付書類の目録

補正書の翻訳文

1 通

特許庁  
- 57.12  
国際出願室

## 国際調査報告

International Application No. PCT/US91/00236

|   |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| 1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor classification, primary class, subclass and IPC)  |  |                       |
| IPC(5): C12N 5/10, 15/09, 15/11, 15/12, 15/03, 15/07; G01N 33/566; C07K 15/06, 15/14, 15/22, 15/28 US Cl: 530/350, 395, 387; 536/27; 435/320.1, 252.3, 240.2, 69.1; 436/503   |  |                       |
| 2. FIELD OF SEARCH  |  |                       |
| Minimum Documentation Searching   |  |                       |
| Classification Symbols  |  |                       |
| U.S. Cl.  | 530/350, 395, 387; 536/27; 435/320.1, 252.3, 240.2; 69.1; 436/503  |                       |
| Documentation Searching other than Minimum Documentation Searching  |  |                       |
| to the extent that such documents are included in the Public Searching  |  |                       |
| APS and DIALOG Files 155, 399, WPI, 35, 340 and 357 for integrin and receptor and (B6 or beta 6) and N-terminal sequences.  |  |                       |
| 3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |  |                       |
| Category  | Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to Claim No. |
| X   | The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 20, issued 15 July 1990. Sheppard et al. "Complete Amino Acid Sequence of a Novel integrin $\beta$ Subunit (B6) Identified in Epithelial Cells Using the Polymerase Chain Reaction, pages 11502-11507. See whole publication; especially the abstract and p. 11505 and 11506. | 1-13<br>1-21          |
| X   | The EMBO Journal, Vol. 8, No 10, issued 1989. Freed et al. "A Novel integrin $\beta$ subunit is associated with the Vitronectin Receptor Alpha Subunit (alpha) is a Human Osteosarcoma Cell Line and is a Substrate for Protein Kinase C", pages 2955-2965. See whole publication; especially the abstract.                      | 1-5<br>1-21           |
| <p>* Special categories of cited documents: *</p> <p>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" documents which may throw doubt on priority claims or which in case to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)</p> <p>"O" documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the invention but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or deemed to be considered to</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with any or more other such documents, each document being viewed as a person skilled in the art.</p> <p>"A" document number of the same patent family</p> |  |                       |
| IV. CERTIFICATION   |  |                       |
| Date of the Agent's Certification of the International Search   | Date of Making of this International Search Report   |                       |
| 21 APRIL 1991   | 22 MAY 1991  |                       |
| International Searching Authority   | INTERNATIONAL DIVISION   |                       |
| ISA/US  | Keith C. Furman  |                       |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (May 1988)

|   |   |                       |
|---|---|-----------------------|
| 16. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) |   |                       |
| Category  | Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to Claim No. |
| Y   | Cell, Vol. 44, issued 28 February 1986. Ruoslahti et al. "ATG-Gly-Asp: A Versatile Cell Recognition Signal", pages 517 and 518. | 14-21                 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (May 1988)

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号

C 1 2 N 1/21 7236 - 4 B

C 1 2 P 21/02 C 9282 - 4 B

G 0 1 N 33/53 D 8310 - 2 J

33/566 9015 - 2 J

// (C 1 2 N 15/09 Z N A

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 シェパード、ディーン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
94610、オークランド、ヒュバート ロー  
ド 1006

F I

C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 クェランタ、ビット  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
92037、ラ ホヤ、ノディングハム プレ  
イス 8861

(72) 発明者 バイテラ、ロバート  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州  
94114、サン フランシスコ、プリント  
ストリート 22